

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie
Leiter: Prof. Dr. med. F.J. Fehrenbach

**UNTERSUCHUNGEN ZUR VIRULENZ VON
LEGIONELLEN IM NORMALEN UND
IMMUNSUPPRIMIERTEN MEERSCHWEINCHEN**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von: Friedrich Kurt Ludwig
aus: Düsseldorf

1968

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie
Leiter: Prof. Dr. med. F.J. Fehrenbach

UNTERSUCHUNGEN ZUR VIRULENZ VON LEGIONELLEN IM
NORMALEN UND IMMUNSUPPRIMIERTEN MEERSCHWEINCHEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von: Friedrich Kurt Ludwig
aus: Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. med. Dr. med. vet. F. Staib

Korreferent: Prof. Dr. med. H. Hahn

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 02.11.1984

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

38. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. in Göttingen, 05.10. - 08.10.1981

"Legionellosis in the immunosuppressed animal"

LUDWIG, F. and FEHRENBACH, F.J.

Inhaltsübersicht

	Seite
I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	7
II. MATERIAL UND METHODEN	
1. Herkunft der Erreger	9
2. Anzucht der Erreger	9
3. Identifizierung der Erreger	9
4. Identifizierung von Legionellen in Gewebepreparaten	11
5. Gewinnung von Antisera	11
6. Inokulation der Versuchstiere	12
6.1. Herstellung und Standardisierung des Inokulums	12
6.2. Kontrolle des Versuchsverlaufes	13
7. Entnahme und Aufarbeitung der Organe	14
III. ERGEBNISSE	
1. Normaler Infektionsversuch - Inokulation nicht immun- supprimierter Tiere	15
1.1. Inokula	15
1.2. Klinische Zeichen einer Infektion	15
1.2.1. Temperaturverlauf	15
1.2.2. Körpergewicht	18
1.2.3. Äußere Krankheitszeichen	20
1.3. Wertigkeit der verschiedenen klinischen Zeichen	20
1.4. Nachweis von Legionellen in Organen	20
1.4.1. Kultureller Nachweis von Legionellen	20
1.4.2. Nachweis von Legionellen mit Hilfe der direkten Immunfluoreszenzmethode	22
1.4.3. Kultureller und fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Legionellen	22
1.5. Klinische Infektionszeichen und Organbefunde	22
1.6. Virulenzunterschiede zwischen L.pneumophila Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) und Serogruppe 4 (Typ Los Angeles)	24
2. Infektionsversuche mit immunsuppressiv vorbehandelten Tieren (Vorbehandlung mit Cyclophosphamid)	26
2.1. Inokula	26
2.2. Klinische Zeichen einer Infektion	26
2.3. Nachweis von Legionellen in Organen	27

	Seite
3. Infektionsversuch mit immunsuppressiv vorbehandelten Tieren (Vorbehandlung mit Cyclophosphamid und Dexamethason)	28
3.1. Inokula	29
3.2. Klinische Zeichen einer Infektion	29
3.3. Nachweis von Legionellen in Organen	33
3.4. Klinische Zeichen einer Infektion mit Nachweis von Legionellen - Unterschiede in Empfindlichkeit und Spezifität	33
3.5. Virulenz von <i>L. pneumophila</i> Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) und Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) für das immunsupprimierte und nicht immunsupprimierte Meer-schweinchen	36
IV. DISKUSSION	38
V. ZUSAMMENFASSUNG	42
VI. LITERATURVERZEICHNIS	43
VII. LEBENS LAUF	49

Verwendete Abkürzungen:

CDC	= Center for Disease Control
CYE	= Charcoal-Yeast-Extract
DIF	= Direkte Immunfluoreszenz
FITC	= Fluorescein Iso-thio-cyanate
h	= Stunde(n)
ip.	= intraperitoneal
L.	= Legionella
M + M	= Material und Methoden
PBS	= Phosphate buffered saline
p.i.	= post inoculationem

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Anlässlich einer epidemieartig aufgetretenen Pneumonie mit hoher Letalität unter Teilnehmern eines Treffens von ehemaligen amerikanischen Kriegsteilnehmern in Philadelphia, U.S.A. (23), gelang im Frühjahr 1978 die Erstisolierung eines neuen bakteriellen Krankheitserregers (36). Bei diesem handelte es sich um ein gram-negatives Stäbchenbakterium, das aufgrund besonderer Färbeeigenschaften und anspruchsvoller Wachstumsbedingungen in vitro dem bisherigen mikrobiologischen Routinenachweis entgangen war. McDade et al. (36) isolierten den Erreger aus post mortem entnommenem Lungengewebe über eine Tierpassage im Meeresschweinchen mit nachfolgender Inokulation des Homogenats der Meerschweinchenmilz in den Dottersack von Hühnerembryonen. Mit der Entwicklung des Charcoal-Yeast-Extrakt-Agars (CYE) durch Feeley & Gorman (21) gelang die problemlose Weiterführung der Kulturen in vitro. Brenner et al. (4) schlugen nach weiteren Untersuchungen vor, das Bakterium taxonomisch in eine neue Familie einzuordnen: *Familia Legionellaceae*.

Nach der Isolierung der Erreger aus Patientenmaterial strebten die Untersucher den Nachweis von Legionellen aus Umweltmaterial an. Aus der epidemiologischen Studie der Philadelphia-Epidemie war die Klimaanlage des Hotels als wahrscheinliche Infektionsquelle der über Aerosol verteilten Keime ermittelt worden (23).

In nun folgenden zahlreichen epidemiologischen Untersuchungen von Umweltproben mit und ohne direkte Beziehung zu Ausbrüchen von Legionärskrankheit (5, 9, 10, 13, 22, 25, 38) gelang die Isolierung von Legionellen über die Meerschweinchenpassage. Zur Erhöhung der Keimdichte wurde in einzelnen Fällen vor der Tierpassage eine Anreicherung der Keime durch Zentrifugation vorgenommen. Hier, wie bei der Verarbeitung von Patientenmaterial, stand der direkten Anzucht über das künstliche Nährmedium entgegen, daß dieses hochwertige Nährstoffe enthält, die sowohl

das Wachstum der gesuchten Keime als auch der vorhandenen Begleitflora unterstützten. Letztere überwucherte in kurzer Zeit die Platten, so daß die langsam wachsenden Legionellen nicht mehr nachgewiesen werden konnten (14). Da inzwischen Selektivmedien auf der Basis des CYE-Agars unter Verwendung verschiedener Supplemente entwickelt wurden (3, 14, 16, 17, 18, 19), konnte eine bessere Selektivität erreicht werden. Mit der Verbesserung der Selektivität wurde jedoch auch eine schlechtere Ausbeute erzielt, so daß der Tierversuch bei der Isolierung von Legionellen aus keimarmem Material (z. B. aus Umweltproben) ebenfalls eingesetzt wurde.

Morris et al. (38) betonten bei ihren Untersuchungen von Umweltmaterial die Notwendigkeit des Tierversuches, da es einerseits falsch positive Ergebnisse mit der direkten Immunfluoreszenz (DIF) und andererseits falsch negative Ergebnisse in der kulturellen Anzucht geben kann. Wie McDade et al. (36) bei der Erstisolierung der Legionellen zeigten, erkrankte das Meerschweinchen bei der Inokulation mit Legionellen in charakteristischer Weise. Daher stellten wir uns die Aufgabe, verschiedene Legionellastämme auf eventuelle Unterschiede in der Virulenz für das Meerschweinchen zu untersuchen. Im Laufe der Untersuchungen stellte sich heraus, daß erhebliche Unterschiede in der infektiösen Dosis für das Versuchstier bezüglich verschiedener Serogruppen bestehen und daher zum Teil hohe Inokula zur Auslösung einer Infektion erforderlich sind. Wir haben uns deshalb im folgenden darauf konzentriert, ein empfindliches Tiermodell zur Isolierung von Legionellen aus keimarmem Material zu entwickeln. Da immunsupprimierte Patienten als Risikopersonen für die Legionellose gelten (2, 26, 41), versuchten wir, eine Infektionsbahnung im Meerschweinchen über eine Immunsuppression zu bewirken. Hierbei orientierten wir uns an den Arbeiten von Pennington (39, 40), der mit Cyclophosphamid und einem Glucocorticoid eine Immunsuppression im Meerschweinchen beschrieben hat.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Herkunft der Erreger

Die in dieser Studie untersuchten Stämme von *L. pneumophila*, Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) und Serogruppe 4 (Typ Los Angeles), wurden vom Center for Disease Control (CDC), Atlanta, bezogen. Die lyophilisierten Stämme wurden in 1 ml 0,1 M PBS, pH 7,6 gelöst. Wir lagerten die Erreger in Schrägagarkulturen auf CYE-Agar bei 4° C oder bei -80° C im Gefrierschrank.

2. Anzucht der Erreger

Als Kulturmedium verwendeten wir den von Feeley & Gorman (21) entwickelten CYE-Agar, den wir in Petrischalen von 9 cm Ø gossen. Das Ausimpfen der Erreger erfolgte im fraktionierten Ösenausstrich oder durch Ausspateln von 0,1 - 0,2 ml Bakterien-suspension bzw. bakterienhaltigem Gewebehomogenat mit dem Drigalskispatel. Wir bebrüteten die so angelegten Kulturen bei 35° C und Wasserdampfsättigung im Brutschrank über 3 - 10 Tage.

3. Identifizierung der Erreger

Die aus tierischem Gewebe isolierten Keime mußten folgende Identifizierungsmerkmale besitzen:

- a) Bei der Anzucht auf CYE-Agar sollten die Einzelkolonien nach ca. 7 - 8 Tagen als graue, konvexe Kolonien mit scharf begrenztem Rand wachsen, und bei Betrachtung im UV-Licht ($\lambda = 300 \text{ nm}$) sollten 4 Tage alte Kulturen eine violette Fluoreszenz zeigen (21). Bei der Isolierung der Erreger aus Mischkulturen wurden auch Kulturen auf Endo-, McConkey- und Blutagar angelegt, um gegebenenfalls Verunreinigungen zu erkennen.

- b) Auf CYE-Agar gewachsene Kolonien, die morphologisch verdächtig waren, wurden weiterhin im Objektträger-Agglutinationstest (44) mit gruppenspezifischen Antisera untersucht. Hierzu wurden verdächtige Kolonien mit der Platinoöse vom Agar abgenommen, in 5 ml PBS suspendiert und ca. 0,1 - 0,2 ml dieser Suspension auf CYE-Agar-Platten ausgespatelt. Der nach 2 - 3 Tagen unter adäquaten Bedingungen angezüchtete Bakterienrasen wurde mit 2,5 - 3 ml 10 %-igem Formaldehyd abgeschwemmt und 15 min. bei Zimmertemperatur inaktiviert. Danach wurde mit einer Pasteurpipette ein Tropfen der Suspension mit gruppenspezifischen Antisera vom Kaninchen (s. 5., S.11) im Objektträger-Agglutinationstest identifiziert. Agglutinationsreaktionen, die nach spätestens 1 min sichtbar waren, wurden protokolliert.
- c) Für die mikroskopische Beurteilung der Keime benutzten wir als Suchmethode eine modifizierte Gramfärbung (42). Bei einer Vergrößerung von 1 : 1200 (Ölimmersion) waren die Keime als schlanke, leicht gebogene, schwach gefärbte gram-negative Stäbchen, teilweise als Filamente zu erkennen. In älteren Kulturen waren die Keime kürzer und plumper, es traten dann vermehrt auch kokkobazilläre Formen auf. Größenverhältnisse: Breite 0,5 - 0,7 μm , Länge 2 - 20 μm .

Zum spezifischen Nachweis von Legionellen wandten wir die direkte Immunfluoreszenztechnik nach der Vorschrift von Cherry et al. (7, 8) an. Bei einer Vergrößerung von 1 : 640 stellten sich die Keime als doppelt konturierte, grünleuchtende Stäbchen oder längere Filamente dar, deren Morphologie der in der Gramfärbung beobachteten entsprach.

4. Identifizierung von Legionellen in Gewebepräparaten

Von den frisch entnommenen Organen wurden Abdruckpräparate auf Objektträgern der Firma Cel-Line Associates, Newfield/N.J., hergestellt; von dem anschließend angefertigten Homogenat wurde der Inhalt einer Platinöse ebenfalls auf einen Objektträger aufgebracht. Nach Hitze-fixierung wurden die Präparate für die Beurteilung mit der direkten Immunfluoreszenzmethode nach Cherry et al. (7, 8) verarbeitet. Wir benutzten zur Gegenfärbung Rhodamin, um die starke unspezifische Gewebefluoreszenz zu unterdrücken. Als positiv bezeichneten wir eine Probe, bei der entweder mehr als 25 intakte spezifisch gefärbte Stäbchen und/oder massenhaft spezifisch angefärbtes bakterielles amorphes Antigen im Objektträgerausstrich sichtbar waren. FITC-markierte gruppenspezifische Kaninchenserum bezogen wir vom CDC, Bioproduct-Division, Atlanta; FITC-markierte Normalserum (Kaninchen) und Rhodamin-konjugierte Kaninchenserum wurden von den Behringwerken, Marburg/Lahn, erhalten.

5. Gewinnung von Antisera

Je 2 Kaninchen wurden über 4 Monate mit Vollantigen von *L. pneumophila* der Serogruppen 1, 2, 3 und 4 immunisiert. Die Herstellung des Antigens und die Immunisierung erfolgte nach Angaben von Wilkinson et al. (44). Die Immunglobuline wurden nach Gewinnung des Serums durch Ammoniumsulfat-Fällung (50 %-ige Sättigung) nach 12-stündigem Rühren (4°C) durch Zentrifugation bei 10.000 x g abgetrennt. Das Präzipitat wurde in PBS, pH 7,4 aufgenommen und das restliche Ammoniumsulfat durch Dialyse gegen PBS (3 x 6 h) entfernt. Das so gewonnene Immunglobulin wurde nach Zugabe von NaN_3 (0,05 % Endkonz.) im Tiefkühlschrank bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

6. Inokulation der Versuchstiere

Als Versuchstiere wählten wir ca. 250 g schwere Meerschweinchen vom Stamm Duncan Hartley (6). Die Tiere waren paarweise in Boxen untergebracht, in denen sie sich während des gesamten Versuchsablaufes ihren Bedürfnissen entsprechend mit Trinkwasser und Nahrung versorgen konnten. Ein Teil (2 Tiere) diente als unvorbehandelte Kontrollgruppe, ein anderer Teil (je 2 Tiere pro Inokulumstufe) wurde einer 7-tägigen immunsuppressiven Vormedikation nach dem Schema von Pennington (39, 40) unterzogen. Diese bestand je nach Versuchsanordnung in der ausschließlichen Gabe von 15 mg/kg Körpergewicht Cyclophosphamid oder in Kombination mit 3,3 mg/kg Körpergewicht Dexamethasonphosphat (1 x tgl.). Cyclophosphamid wurde intraperitoneal injiziert, wobei eine Bauchfalte angehoben und parallel zu dieser die Kanüle eingeführt wurde. Vor der Injektion wurde aspiriert, um eine eventuelle intravasale Injektion auszuschließen. Dexamethason wurde sc. in der Leistengegend appliziert.

Nach Abschluß der immunsuppressiven Medikation wurde den Tieren nach 1-tägiger Pause die jeweilige Bakteriensuspension in 1 ml steriler PBS intraperitoneal (36) in der oben beschriebenen Technik injiziert.

6.1. Herstellung und Standardisierung des Inokulums

CYE-Agar-Platten wurden mit standardisiertem Inokulum im Ösenausstrich beimpft. Nach 2 - 3 Tagen Bebrütung bei 35° C stellten wir eine Bakteriensuspension durch Einimpfen einer Kolonie in PBS her. Die Keimzahl dieser Suspension wurde durch Herstellen einer Verdünnungsreihe (10-er Schritte) und durch Ausimpfen eines Aliquots der Verdünnungen auf CYE-Agar im Plattentest ermittelt. Die Qualität der Nährböden wurde laufend mit einem Standardinokulum überprüft.

6.2. Kontrolle des Versuchsverlaufes

Während des gesamten Versuches wurden täglich bei den Tieren folgende Parameter registriert:

- Körpertemperatur:

Die Körpertemperatur wurde rektal mit einem elektrischen Thermometer gemessen. Als Beweis für eine Erkrankung der Tiere werteten wir einen Anstieg und eine mindestens 2 Tage nach Inokulation der Erreger noch vorhandene Erhöhung der Rektaltemperatur von mehr als 1° C. Der Bezugswert wurde aus den Meßwerten gemittelt, die vor der Inokulation der Erreger festgestellt worden waren.

- Körpergewicht:

Das Körpergewicht wurde mit einer Tierwaage auf 5 g genau bestimmt. Für die Inokulation der Keime bildeten wir Paare, bei denen das Individualgewicht nicht mehr als 10 % von einem gemeinsamen Mittelwert abwich. Als beweisend für eine Erkrankung sahen wir eine Gewichtseinbuße an, die am 2. Tag post inoculationem (p.i.) noch vorhanden war. Als Bezugswert diente das Gewicht am Tage der Inokulation.

- Aspekt und Verhalten:

Als äußere Zeichen einer Erkrankung beobachteten wir, daß sich die Tiere nach einer Infektion nicht mehr wie gewohnt bewegten sowie auffällige Freß- und Trinkgewohnheiten zeigten. Als weitere Krankheitszeichen wurden struppiges Fell, eingefallene Flanken, feuchte glänzende Augen oder verklebte Lider gewertet.

7. Entnahme und Aufarbeitung der Organe

Erkrankte Tiere wurden, falls nicht früher indiziert, am 4. Tag p.i. getötet. Wir wählten den 4. Tag, da nach Angaben von Chandler et al. (6) bei intraperitonealer Inokulation beim Meerschweinchen zu diesem Zeitpunkt eine Bakteriämie erfolgt ist und eine septische Aussaat der Erreger in alle Organe erwartet werden kann. Die übrigen Tiere wurden nach spätestens 8 Tagen getötet.

Die Entnahme der Organe fand unter sterilen Bedingungen statt. Von den ausgewählten Organen zweigten wir sofort nach der Sektion mehrere Proben ab, die nach der Anfertigung von Abdruckpräparaten für die direkte Immunfluoreszenzmikroskopie im Potter-Elvehjhan-Homogenisator unter Eiskühlung in einer Vorlage von 1 ml steriler PBS homogenisiert wurden.

Das Homogenat wurde weiter in PBS im Verhältnis 1 : 10 (V/V) verdünnt. Einen Teil dieser Gewebesuspension lagerten wir bei -80°C im Gefrierschrank ein. Gleichzeitig beimpften wir CYE-Agar-Platten zur Anzucht von Legionellen. Zur Kontrolle wurde das Homogenat auch auf Blutagar ausgeimpft. Jeweils 0,2 ml der Suspension wurden mit dem Drigalskispatel gleichmäßig auf der Plattenoberfläche verteilt. Die so angelegten Kulturen wurden über 10 Tage beobachtet und angezüchtete Kolonien nach den unter Punkt 3. (s.S.9/10) geschilderten Verfahren und Beurteilungskriterien ausgewertet.

III. ERGEBNISSE

1. Normaler Infektionsversuch - Inokulation nicht immunsupprimierter Tiere

Ziel dieses Versuches war es, die Virulenz von *L. pneumophila* der Serogruppen 1 und 4 im nicht immunsuppressiv vorbehandelten Meerschweinchen zu ermitteln.

1.1. Inokula

Als Inokula wählten wir Suspensionen mit 10^5 - 10^1 Keimen/ml von *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Typ Philadelphia), wobei die Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Inokula jeweils 1 log-Stufe betrugen. Für *L. pneumophila* Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) erweiterten wir die Konzentrationsreihe bis zu einem Inokulum von 10^9 Keimen/ml, nachdem die Infektion mit Inokula geringer Keimzahl nicht gelungen war.

1.2. Klinische Zeichen einer Infektion

Diejenigen Inokula, die gerade noch eine klinisch objektivierbare Infektion im Meerschweinchen hervorriefen, werden im folgenden als Schwellendosis bezeichnet.

1.2.1. Temperaturverlauf

Nach erfolgter Inokulation wurde täglich die Körpertemperatur rektal gemessen. Infizierte und nicht infizierte Tiere zeigten hierbei jeweils typische Verläufe (s. Abb. 1).

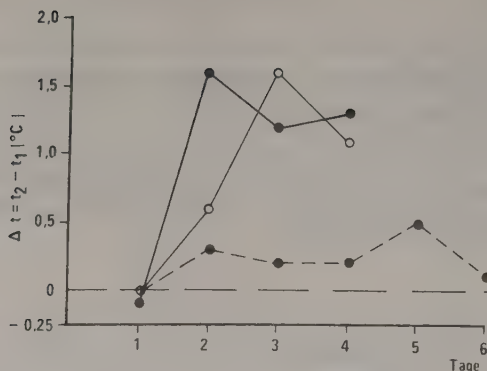


Abb. 1: Verlauf der Körpertemperatur bei nicht immunsupprimierten Tieren nach ip.-Inokulation von *L. pneumophila*

nicht infektiöse Dosis (●-●-●)

Schwellendosis (minimale Keimdosis zur Erzielung einer Septikämie) (o-o-o); 100-fache Schwellendosis (●-●-●);

Basistemperatur (---)

Temperaturdifferenz $\Delta t = t_2 - t_1$

t_1 [°C] = Basistemperatur

t_2 [°C] = gemessene Körpertemperatur

Tag 1 = Tag der Inokulation (t_2 vor Inokulation)

Mit der 100fachen Schwellendosis inokulierte Tiere entwickelten innerhalb eines Tages Temperaturanstiege von mehr als 1° C, die mindestens 2 Tage bestehen blieben. Tiere, die gerade die Schwellendosis für eine Infektion bekamen, zeigten einen langsameren Temperaturanstieg, lagen am 2. Tag p.i. aber auch mindestens 1° C über ihrer Basistemperatur. Tiere mit nicht infektiösen Inokula wiesen - wenn überhaupt - nur ganz geringe Temperaturschwankungen p.i. auf. Für *L. pneumophila* Serogruppe 1

(Typ Philadelphia) war ein signifikanter Temperaturanstieg schon bei einem Inokulum von $\geq 10^2$ Keimen/ml nachweisbar, für *L. pneumophila* Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) erst bei $\geq 10^8$ Keimen/ml (s. Tab. I und II).

Tab. I: ip.-Infektion des Meerschweinchens mit *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Typ Philadelphia)

Inokulum (Keimzahl)	äußere Krankheits- zeichen	Gewichts- verlust	Temperatur- anstieg
10^5	+	+	+
10^4	+	+	+
10^3	-	+	+
10^2	-	+	+
10^1	-	-	-

Tab. II: ip.-Infektion des Meerschweinchens mit *L. pneumophila* Serogruppe 4 (Typ Los Angeles)

Inokulum (Keimzahl)	äußere Krankheits- zeichen	Temperatur- anstieg
10^9	-	+
10^8	-	+
10^7	-	-
10^6	-	-
10^5	-	-

Da wir infizierte Tiere schon am 3. bzw. 4. Tag p.i. töteten, war der von Berendt et al. (1) beschriebene präfinale Temperaturabfall unter die Basistemperatur bei letalen Dosen nicht zu beobachten.

1.2.2. Körpergewicht

Auch bei der täglichen Kontrolle des Körpergewichts ergaben sich p.i. typische Verläufe für infizierte und nicht infizierte Tiere.

Die normale Gewichtszunahme betrug 3 - 4 % (bezogen auf das Körpergewicht am Tag der Inokulation). Wie aus der Abb. 2 hervorgeht, reagierten alle Tiere unabhängig vom Inokulum auf die intraperitoneale Injektion von Keimen am 1. Tag p.i. mit einem Gewichtsstillstand bzw. einer geringen Gewichtseinbuße. Nicht infizierte Tiere hielten dann jedoch das Gewicht und setzten nach spätestens 2 Tagen die unterbrochene Gewichtszunahme fort. Mit der Schwellendosis inokulierte Tiere verloren am 2. Tag p.i. noch an Gewicht, nahmen am darauffolgenden Tage aber wieder deutlich an Gewicht zu. Die mit der 100-fachen Schwellendosis inokulierten Tiere zeigten ab dem 2. Tage p.i. deutliche Gewichtseinbußen, die sich auch am folgenden Tage fortsetzten.

Signifikante Gewichtseinbußen zeigten die mit *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) inokulierten Tiere ab einem Inokulum von $\geq 10^3$ Keimen/ml.

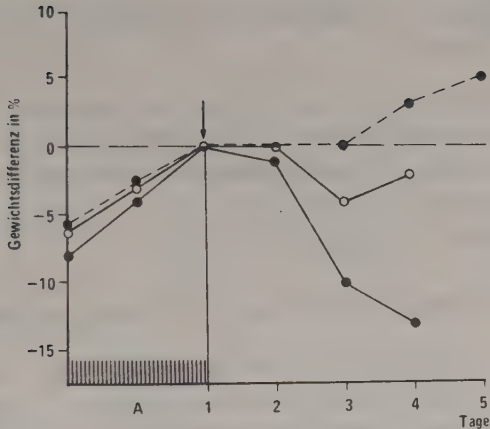


Abb. 2: Verlauf der Gewichtsentwicklung nicht immunsupprimierter Tiere vor und nach Inokulation von *L. pneumophila*
 Nicht infektiöse Dosis (-o--o-); Schwellendosis (minimale Keimdosis zur Erzielung einer Septikämie) (-o-o-);
 100-fache Schwellendosis (-●-●-)

Beobachtungszeitraum zur Ermittlung der durchschnittlichen Gewichtszunahme vor Inokulation (|||||)

Gewichtsdifferenz in %: Prozente bezogen auf das Gewicht am Tage der Inokulation (+);

Tag 1 = Tag der Inokulation (Gewicht vor Inokulation)

1.2.3. Äußere Krankheitszeichen

Nach der Inokulation entwickelten einige Tiere innerhalb von 24 h Veränderungen in Aussehen und Verhalten (1), die auf eine Infektion hinwiesen.

Bei *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) stellten wir äußere Krankheitszeichen bei Tieren mit Inokula von $\geq 10^4$ Keimen/ml fest (s. Tab. I, S.17); die mit *L. pneumophila* Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) infizierten Tiere zeigten keine äußeren Krankheitszeichen (s. Tab. II, S.17).

1.3. Wertigkeit der verschiedenen klinischen Zeichen

Wenn man die o.a. klinischen Zeichen hinsichtlich ihrer Bedeutung für den Nachweis einer Infektion wertet, so erwies sich in den Versuchen der Anstieg der Körpertemperatur neben einer Gewichtseinbuße als empfindlicher und verlässlicher Parameter (s. Tab. I und II, S.17).

1.4. Nachweis von Legionellen in Organen

Bereits bei der Sektion war bei Tieren, die klinische Zeichen einer Infektion gezeigt hatten, in der Regel eine Splenomegalie nachweisbar. Gelegentlich fiel bei diesen Tieren eine gelbweiße Tüpfelung der Organoberflächen und Schnittflächen der Leber und Milz auf.

1.4.1. Kultureller Nachweis von Legionellen

Kulturell gelang der Nachweis von Legionellen bei infizierten Tieren in der Regel am sichersten aus Milzhomogenaten, bei hoher infektiöser Dosis auch aus dem Leber- und/oder Lungenhomogenat. Da sich der Nachweis aus Milzhomogenaten als empfindlicher Indikator einer Septikämie erwies (30), beschränkten wir uns in der Folge auf die Bearbeitung der Milzhomogenate.

Der kulturelle Nachweis gelang bei *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) ab einem Inokulum von $\geq 10^2$ Keimen/ml, bei *L. pneumophila* Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) ab $\geq 10^8$ Keimen/ml (s. Tab. III/IV).

Tab. III: ip.-Infektion des Meerschweinchens mit *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Typ Philadelphia)

Inokulum (Keimzahl)	Kultur	DIF
10^5	+	+
10^4	+	+
10^3	+	+
10^2	+	-
10^1	-	-

Tab. IV: ip.-Infektion des Meerschweinchens mit *L. pneumophila* Serogruppe 4 (Typ Los Angeles)

Inokulum (Keimzahl)	Kultur	DIF
10^9	+	-
10^8	+	-
10^7	-	-
10^6	-	-
10^5	-	-

1.4.2. Nachweis von Legionellen mit Hilfe der direkten Immunfluoreszenzmethode.....

Wir führten den direkten Immunfluoreszenztest mit Abdruckpräparaten sowie mit Ausstrichpräparaten aus Organhomogenaten durch. Es ergaben sich keine Unterschiede in der Nachweisempfindlichkeit zwischen den beiden Verfahren. Wie beim kulturellen Nachweis von Legionellen aus Organen zeigte sich auch hier die Milz am besten geeignet für den Nachweis einer Legionellenseptikämie. Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis in der Milz gelang bei *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) ab einem Inokulum von $\geq 10^3$ Keimen/ml; bei *L. pneumophila* Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) konnten mit keiner der verwendeten Keimsuspensionen ($10^5 - 10^9$ Keime/ml) Erreger in der Milz des Meerschweinchens nachgewiesen werden (s. Tab. III und IV, S.21).

1.4.3. Kultureller und fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Legionellen.....

Wie aus den Tabellen III und IV ersichtlich ist, war in unseren Versuchen die Anzucht der Erreger aus Homogenaten dem fluoreszenzmikroskopischen Nachweis um mindestens 1 log-Stufe überlegen. Dies steht zum Teil im Widerspruch zu Angaben in der Literatur, wo nach Morris et al. (38) und Katz et al. (30) die Kultur dem fluoreszenzmikroskopischen Nachweis ebenfalls überlegen ist, während bei Winn et al. (45) letzterer jedoch das empfindlichere Verfahren darstellt.

1.5. Klinische Infektionszeichen und Organbefunde

Bei kultureller Anzucht wies in der Regel auch der Verlauf der Körpertemperatur auf eine Infektion hin (s. Tab. V/VI, S.23).

Tab. V: ip.-Infektion des Meerschweinchens mit *L. pneumophila*
Serogruppe 1 (Typ Philadelphia)

Inokulum (Keimzahl)	Temperatur- anstieg	Kultur
10^5	+	+
10^4	+	+
10^3	+	+
10^2	+	+
10^1	-	-

Tab. VI: ip.-Infektion des Meerschweinchens mit *L. pneumophila*
Serogruppe 4 (Typ Los Angeles)

Inokulum (Keimzahl)	Temperatur- anstieg	Kultur
10^9	+	+
10^8	+	+
10^7	-	-
10^6	-	-
10^5	-	-

Bei 2 mit *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) inokulierten Tieren fand sich trotz signifikanten Temperaturanstieges und Gewichtsverlustes kein Nachweis von Erregern in der Milz, der bei mit gleichen Keimdosen beimpften Kontrolltieren jedoch gelungen war. Da in diesen beiden Fällen eine unspezifische Infektion nicht ganz auszuschließen war und aus der Literatur (35) bekannt ist, daß nicht alle Meerschweinchen nach der Injektion einer als infektiös geltenden Keimmenge erkranken, werteten wir nur den Erregernachweis in Organen als sicheres Zeichen einer Infektion.

1.6. Virulenzunterschiede zwischen *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) und Serogruppe 4 (Typ Los Angeles)

Wie aus der Tab. VII ersichtlich ist, liegen zwischen den jeweiligen Inokula mit infektiöser Schwellendosis von *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) und Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) Keimzahlunterschiede von 6 log-Stufen. Bei Typ Philadelphia gelang eine Infektion schon mit $\geq 10^2$ Keimen/ml, bei Typ Los Angeles erst mit $\geq 10^8$ Keimen/ml (s. Tab. VII, S. 25).

Diese Befunde zeigen, daß die Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) von *L. pneumophila* bei intraperitonealer Inokulation des Meerschweinchens deutlich virulenter als die Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) ist.

Tab. VII: Vergleich der Infektionstüchtigkeit von *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) und Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) im Meerschweinchen bei ip.-Inokulation

Inokulum (Keimzahl)	Legionella pneumophila	
	Serogruppe 4 Typ Los Angel.	Serogruppe 1 Typ Phila.
10^9	+	n.u.
10^8	+	n.u.
10^7	-	n.u.
10^6	-	+
10^5	-	+
10^4	-	+
10^3	-	+
10^2	-	+
10^1	-	-

+ = DIF und/oder Kultur positiv

- = Kultur und DIF negativ

n.u. = nicht untersucht

2. Infektionsversuche mit immunsuppressiv vorbehandelten Tieren (Vorbehandlung mit Cyclophosphamid)

In Anlehnung an die Versuche von Pennington (39, 40) verwendeten wir immunsupprimierte Meerschweinchen. Eine Infektionsbahnung wurde daher zuerst durch intraperitoneale Gabe von Cyclophosphamid versucht. (Dosis vergl. S. 12).

2.1. Inokula

Als Inokulum wählten wir den Typ Los Angeles der Serogruppe 4 von *L. pneumophila* aus, der sich durch seine geringe Virulenz, wie im vorangegangenen Versuch gezeigt wurde (Tab. VII, S. 25), als zweckmäßig anbot. Im nicht immunsupprimierten Tier lagen die infektiösen Dosen bei $\geq 10^8$ Keimen/ml nach ip.-Inokulation. Mit immunsupprimierten Tieren wurden daher Infektionsversuche mit $10^3 - 10^7$ Keimen/ml bei ip.-Gabe durchgeführt.

2.2. Klinische Zeichen einer Infektion

Als Infektionsindikatoren wurden die oben beschriebenen Parameter gemessen.

Während der Cyclophosphamidgabe lag die Körpertemperatur im Bereich der Norm. Signifikante Temperaturanstiege (M + M) beobachteten wir nur nach Infektion der Tiere mit *L. pneumophila* Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) in Keimzahlen von 10^3 , 10^5 und 10^6 Keimen/ml.

Im Vergleich zum normalen Tier nahm das Körpergewicht während der 7-tägigen immunsuppressiven Vormedikation nur sehr langsam oder gar nicht zu. Wir führten dies auf den Effekt der immunsuppressiven Behandlung zurück. Eine signifikante Gewichteinbuße nach ip.-Inokulation konnte bei keiner der verwendeten Keimsuspensionen beobachtet werden.

Im Vergleich zu normalen Tieren waren alle immunsupprimierten Tiere vor und nach Inokulation in Verhalten und Aussehen (M + M) unauffällig.

2.3. Nachweis von Legionellen in Organen

Bei den mit Cyclophosphamid vorbehandelten Tieren wurden unabhängig vom Inokulum aus der homogenisierten Milz in keinem Fall Erreger angezüchtet.

Bei einem Tier mit einem Inokulum von 10^4 Keimen/ml fanden sich > 50 typische Stäbchen im Lungenabdruckpräparat; das Milzabdruckpräparat enthielt dagegen nur zwei typische Stäbchen. Bei einem mit 10^3 Keimen/ml inokulierten Tier sahen wir 16 typische Stäbchen im Lungenabdruckpräparat; das Milzabdruckpräparat war hier jedoch negativ. In der Kultur der beiden Lungenhomogenate wuchsen keine Legionellen, lediglich Sporenbildner, die aber in der DIF keine Reaktion mit spezifischen Legionellaantisera zeigten.

Eine Tierpassage von L. pneumophila Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) ist somit mit den von uns untersuchten Keimsuspensionen ($10^3 - 10^7$ Keimen/ml) nicht geglückt. Auffällig sind jedoch die vereinzelt positiven fluoreszenzmikroskopischen Befunde in den Lungenabdruckpräparaten. Wie im vorhergehenden Experiment bereits beschrieben, sahen wir auch bei der Inokulation mit Cyclophosphamid vorbehandelter Tiere signifikante Temperaturanstiege ohne spätere Kultivierung von Legionellen aus dem Milzhomogenat (Zusammenfassung der Ergebnisse s. Tab. VIII).

Tab. VIII: Infektionsversuch im immunsupprimierten Tier
(Cyclophosphamid) mit *L. pneumophila* Serogruppe 4
(Typ Los Angeles)

Inokulum (Keimzahl)	Klinische Zeichen einer Infektion			Kultur	DIF
	äußere Krankheits- zeichen	Gewichts- verlust	Temperatur- anstieg		
10^7	-	-	-	-	-
10^6	-	-	+	-	-
10^5	-	-	+	-	-
10^4	-	-	-	-	+
					(nur Lunge)
10^3	-	-	+	-	16 Stäbe
					(nur Lunge)

3. Infektionsversuch mit immunsuppressiv vorbehandelten Tieren
(Vorbehandlung mit Cyclophosphamid und Dexamethason)

Da nach Vorbehandlung mit Cyclophosphamid kein Effekt im Sinne einer Infektionsbahnung erzielt wurde, ergänzten wir die immunsuppressive Vorbehandlung durch die kombinierte Gabe von Cyclophosphamid und Dexamethason. (Dosis vergl. S. 12).

3.1. Inokula

Für die Inokulation des Meerschweinchens wurde wie im vorangegangenen Experiment *L. pneumophila* Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) benutzt. Die infektiöse Dosis für das nicht immunsupprimierte Tier lag bei $\geq 10^8$ Keimen/ml (s. Tab. VII, S. 25). Zum Vergleich zogen wir den Typ Philadelphia der Serogruppe 1 von *L. pneumophila* heran, bei dem die infektiöse Dosis für das nicht immunsupprimierte Tier mit $\geq 10^2$ Keimen/ml ermittelt worden war (s. Tab. VII, S. 25).

Als Inokula wählten wir für die Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) Keimsuspensionen mit $10^2 - 10^9$ Keimen/ml, für die Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) Suspensionen mit $10^1 - 10^5$ Keimen/ml.

3.2. Klinische Zeichen einer Infektion

Als Infektionsindikatoren wurden die bereits beschriebenen Parameter gemessen.

Vor der Inokulation unterlagen die Tiere keinen großen Schwankungen der Körpertemperatur. Nach der Inokulation sahen wir wiederum typische Verläufe für infizierte und nicht infizierte Tiere (s. Abb. 3)

Die mit der 100-fachen Schwellendosis inokulierten Tiere entwickelten innerhalb von 24 h ausgeprägtes Fieber mit Temperaturmaxima $\geq 2^\circ \text{C}$ über ihrer Normaltemperatur, das in den darauffolgenden Tagen bestehen blieb oder nur leicht abfiel. Bei den Tieren, die die infektiöse Schwellendosis erhalten hatten, beobachteten wir zwei Verlaufsformen. Einmal sahen wir eine abgeschwächte Form des oben beschriebenen Typs (Verlaufstyp 1), wobei das Maximum des Temperaturanstieges sich erst nach 48 h einstellte und auch nur $1 - 1,5^\circ \text{C}$ über der Normaltemperatur des Tieres lag. Regelmäßig normalisierte sich die Körpertemperatur wieder vom 2. - 3. Tag p.i.

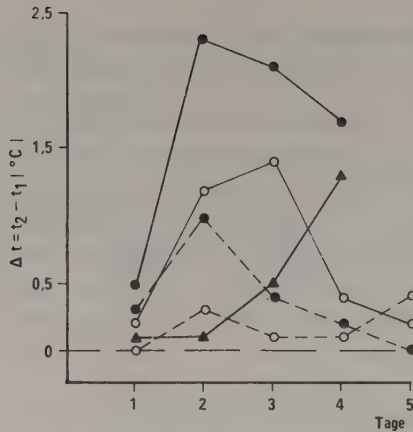


Abb. 3: Verlauf der Körpertemperatur bei immunsupprimierten Tieren (15 mg Cyclophosphamid/kg Körpergewicht ip. und 3,3 mg Dexamethason/kg Körpergewicht sc., 1 x tägl. über 7 Tage bis 1 Tag vor Inokulation) nach ip.-Inokulation von *L. pneumophila*.

Nicht infektiöse Dosis (—●—●—); Schwelldosis (minimale Keimdosis zur Erzielung einer Septikämie), Verlaufstyp 1 (s. Text) (—○—○—); Schwelldosis, Verlaufstyp 2 (s. Text) (—▲—▲—); 100-fache Schwelldosis (—●—●—); Kochsalzkontrolle (—○—○—); Basistemperatur (— — —).

Temperaturdifferenz $\Delta t = t_2 - t_1$

t_1 [°C] = Basistemperatur

t_2 [°C] = gemessene Körpertemperatur

Tag 1 = Tag der Inokulation (t_2 vor Inokulation)

Daneben registrierten wir ein langsames Ansteigen der Körpertemperatur (Verlaufstyp 2), die erst am 3. Tag p.i. mindestens 1° C über der Normaltemperatur lag. Mit nicht infektiösen Dosen inokulierte Tiere entwickelten innerhalb von 24 h einen

Anstieg der Körpertemperatur, der sich in den darauffolgenden 24 h jedoch wieder normalisierte. Bei nur mit Kochsalz inokulierten Tieren wurden keine signifikanten Schwankungen der Körpertemperatur beobachtet.

Wie schon unter der immunsuppressiven Therapie bei alleiniger Gabe von Cyclophosphamid beobachtet wurde, nahmen die Tiere auch während der kombinierten Vorbehandlung weniger an Gewicht zu als normale Tiere. Die tägliche Zuwachsrate lag bei nicht vorbehandelten Tieren zwischen 3 - 4 % (bezogen auf das Körpergewicht am Tage der Inokulation), gegenüber nur 0,5 - 2 % in der Gruppe der Tiere, die eine kombinierte Immunsuppression erhielten.

Alle mit Legionellen inokulierten Tiere nahmen regelmäßig am 1. Tag p.i. etwas an Gewicht ab (s. Abb. 4, S. 32). Bei der 100-fachen Schwellendosis verstärkte sich die Gewichtsabnahme während der darauffolgenden 1 - 2 Tage. Bei den mit der infektiösen Schwellendosis inokulierten Tieren verzeichneten wir zwei unterschiedliche Verläufe. Im ersten Fall (Verlaufstyp 1) stagnierte die Gewichtszunahme vom 1. - 2. Tag p.i., setzte sich dann wieder fort und übertraf vom 3. Tage ab den Ausgangswert. Andererseits beobachteten wir (Verlaufstyp 2), daß am 1. Tag p.i. noch eine Gewichtszunahme erfolgte, die 2 Tage p.i. in eine deutliche Gewichtsabnahme überging. Drei Tage nach Infektion registrierten wir auch hier eine Gewichtszunahme über den Ausgangswert. Mit nicht infektiösen Dosen inokulierte Tiere übertrafen bereits am 2. Tage p.i. ihr Ausgangsgewicht. Nur bei mit Kochsalz inokulierten Tieren setzte sich die normale Gewichtsentwicklung fort, wobei die gegen Ende der Beobachtungsphase einsetzende größere Zuwachsrate wohl mit dem Absetzen der immunsuppressiven Behandlung in Zusammenhang steht.

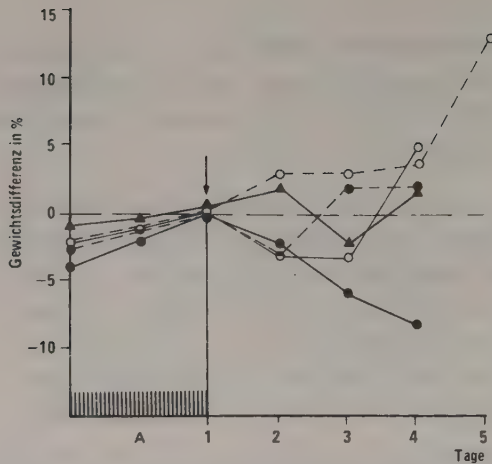


Abb. 4: Verlauf der Gewichtsentwicklung immunsupprimierter Tiere (15 mg Cyclophosphamid/kg Körpergewicht ip. und 3,3 mg Dexamethason/kg Körpergewicht sc., 1 x tägl. über 7 Tage bis 1 Tag vor Inokulation) vor und nach ip.-Inokulation von *L. pneumophila*.

Nicht infektiöse Dosis (-●-●-); Schwellendosis (minimale Keimdosis zur Erzielung einer Septikämie), Verlaufstyp 1 (s. Text) (-○-○-); Schwellendosis (s.o.), Verlaufstyp 2 (s. Text) (-▲-▲-); 100-fache Schwellendosis (-●-●-); Kochsalzkontrolle (-○-○-).

Beobachtungszeitraum zur Ermittlung der durchschnittlichen Gewichtszunahme vor Inokulation (|||||).

Gewichtsdifferenz in %: Prozente bezogen auf das Gewicht am Tage der Inokulation (+).

Tag 1 = Tag der Inokulation (Gewicht vor Inokulation).

Keines der mit *L. pneumophila* Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) inokulierten Tiere gab durch sein Verhalten oder Aussehen Hinweis auf eine Infektion. Die mit *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) inokulierten Tiere fielen ab einer Dosis von $\geq 10^3$ Keimen/ml durch Bewegungsarmut und typische Aussehensmerkmale (M + M) auf.

3.3. Nachweis von Legionellen in Organen

Bei den mit *L. pneumophila* Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) inokulierten Tieren gelang eine Anzucht der Erreger aus dem Milzhomogenat ab einem Inokulum von $\geq 10^8$ Keimen/ml. Die Milzhomogenate der mit *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) inokulierten Tiere ergaben bereits mit einem Inokulum von $\geq 10^2$ Keimen/ml eine positive Kultur.

Mit Hilfe der Direkten Immunfluoreszenz gelang der Nachweis von spezifisch angefärbten Stäbchen im Milzabdruckpräparat je nach Virulenz des Erregers ab einem Inokulum von $\geq 10^8$ Keimen/ml (*L. pneumophila* Serogruppe 4, Typ Los Angeles) bzw. $\geq 10^2$ Keimen/ml (*L. pneumophila* Serogruppe 1, Typ Philadelphia). Aus der Milz eines mit *L. pneumophila* Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) inokulierten Tieres gelang einmal mit der DIF der Nachweis von sich spezifisch anfärbenden Organismen, ohne daß dieser fluoreszenzmikroskopische Befund kulturell bestätigt werden konnte. Das parallel mit der gleichen Keimzahl infizierte Tier war kulturell und fluoreszenzmikroskopisch positiv. Mit dieser Ausnahme war die Kultur der DIF im Nachweis einer Legionellenseptikämie überlegen.

3.4. Klinische Zeichen einer Infektion mit Nachweis von Legionellen - Unterschiede in Empfindlichkeit und Spezifität

Auch bei immunsupprimierten Tieren war der Temperaturanstieg ein empfindlicher klinischer Indikator. Bei den mit *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) infizierten Tieren fand sich jedoch zweimal ein signifikanter Temperaturanstieg, ohne daß ein kultureller Nachweis aus dem Milzhomogenat folgte. Die parallel mit gleichen Inokula infizierten Tiere waren in der Kultur positiv. Abgesehen von diesen Ausnahmen korrelierte der Temperaturanstieg mit dem Nachweis von Legionellen in Organen.

Die Tabellen IX und X zeigen für *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) und Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) jeweils im direkten Vergleich die Nachweisgrenze einer Infektion anhand der klinischen Zeichen und des Erregernachweises.

Tab. IX: Infektionsversuch im immunsupprimierten Tier (Cyclophosphamid und Dexamethason) mit *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Typ Philadelphia)

Inokulum (Keimzahl)	Klinische Zeichen einer Infektion			Kultur	DIF
	äußere Krankheits- zeichen	Gewichts- verlust	Temperatur- anstieg		
10^5	+	+	+	+	+
10^4	+	+	+	+	+
10^3	+	+	+	+	-
10^2	-	+	+	+	-
10^1	-	-	-	-	-

Tab. X: Infektionsversuch im immunsupprimierten Tier (Cyclophosphamid und Dexamethason) mit *L. pneumophila* Sero-
gruppe 4 (Typ Los Angeles)

Inokulum (Keimzahl)	Klinische Zeichen einer Infektion			Kultur	DIF
	äußere Krankheits- zeichen	Gewichts- verlust	Temperatur- anstieg		
10^9	-	+	+	+	+
10^8	-	+	+	+	+
10^7	-	-	-	-	-
10^6	-	-	-	-	-
10^5	-	-	-	-	-
10^4	-	-	-	-	-
10^3	-	-	-	-	-
10^2	-	-	-	-	-

3.5. Virulenz von *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) und Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) für das immunsupprimierte und nicht immunsupprimierte Meerschweinchen

Die Tabelle XI (S. 37) zeigt, daß bei intraperitonealer Inokulation von $\geq 10^2$ Keimen/ml der Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) bzw. $\geq 10^8$ Keimen/ml der Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) im immunsupprimierten Tier eine Infektion gesetzt werden konnte. Für das nicht immunsupprimierte Tier waren dieselben infektiösen Dosen ermittelt worden (s. Tab. VII, S. 25).

Der für das normale Tier objektivierte Virulenzunterschied von 6 log-Stufen zwischen *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) und Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) läßt sich auch im immunsupprimierten Tier dokumentieren. Daraus folgt, daß für die beiden untersuchten Stämme von *L. pneumophila* mit der von uns durchgeführten Immunsuppression eine Infektionsbahnung im Meerschweinchen nicht gelungen ist.

Tab. XI: Virulenzunterschiede im immunsupprimierten bzw. nicht immunsupprimierten Versuchstier zwischen L. pneumophila Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) und Serogruppe 4 (Typ Los Angeles)

Inokulum (Keimzahl)	L.A.*	Phil.*	L.A.°	Phil.°
10^9	+	n.u.	+	n.u.
10^8	+	n.u.	+	n.u.
10^7	-	n.u.	-	n.u.
10^6	-	n.u.	-	+
10^5	-	+	-	+
10^4	-	+	-	+
10^3	-	+	-	+
10^2	-	+	-	+
10^1	n.u.	-	n.u.	-

Zeichenerklärung:

- ° = nicht vorbehandelt
- * = immunsuppressiv vorbehandelt
- + = DIF und/oder Kultur positiv
- n.u. = nicht untersucht
- L.A. = Typ Los Angeles
- Phil. = Typ Philadelphia

IV. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Studie war es, ein Modell zum empfindlichen Nachweis von Legionellen aus keimarmem Material zu entwickeln und verschiedene Legionellenstämme auf Virulenzunterschiede zu untersuchen.

Die Ergebnisse belegen, daß Legionellen verschiedener Serogruppen - z.B. L. pneumophila Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) und Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) - bei Inokulation im Meerschweinchen erhebliche Virulenzunterschiede aufweisen. Diese drücken sich zahlenmäßig in einer Differenz von 6 log-Stufen bei den infektiösen Inokula aus. Die Virulenz der Serogruppe 1 hat ihre Parallele im Vorkommen in der Natur (22, 38) und der Nachweis-häufigkeit in klinischem Untersuchungsgut (16, 37).

Bei den registrierten klinischen Zeichen einer Infektion erwies sich die Temperaturerhöhung als empfindlicher, zuverlässiger und zugleich einfach zu bestimmender Parameter. Der Gewichtsverlust war zwar ebenso empfindlich aber schwieriger zu beurteilen (Abhängigkeit des Körpergewichts vom Freß-, Trink- und Defäkationsverhalten der Tiere). Die äußeren Krankheitszeichen (Verhalten, Aussehen) waren nur bei stark erkrankten Tieren eindrucksvoll.

Beim Erregernachweis in Organen infizierter Tiere war in unseren Versuchen die Kultur der Direkten Immunfluoreszenz überlegen. Bei divergierenden Ergebnissen beider Verfahren verließen wir uns auf die Anzucht der Erreger und werteten ein positives Ergebnis in der Direkten Immunfluoreszenz nur bei gleichzeitiger positiver Kultur. Die in der Literatur angegebenen Kreuzreaktionen zwischen Legionellen und anderen Erregern (15, 34, 43) und die von uns und anderen Autoren (38) beobachtete Überlegenheit der Kultur gegenüber der Direkten Immunfluoreszenz

bei der Auswertung von Tierversuchen veranlaßte uns zu einer zurückhaltenden Bewertung bei alleinigem positiven Resultat in der Direkten Immunfluoreszenz.

Da wir auch signifikante Temperaturerhöhungen ohne spezifischen Erregernachweis sahen, werteten wir letztlich nur die Anzucht der Erreger als Nachweis einer Legionelleninfektion.

Gemessen an diesen Kriterien ist eine Infektionsbahnung im mit Cyclophosphamid immunsupprimierten Tier nicht gelungen, obwohl hier vereinzelt positive Ergebnisse in der DIF von Lungenabdruckpräparaten in niedrigeren Inokulationsstufen vorlagen. Die Annahme, daß sich die Legionellen im immunsupprimierten Tier bevorzugt in der Lunge ansiedeln, die bei der natürlichen aerogenen Infektion des Menschen das Zielorgan darstellt, bestätigte sich in weiteren Experimenten jedoch nicht. Auch bei zusätzlicher Gabe eines Glucocorticoids wurde eine Infektionsbahnung für ip. verabreichte Legionellen nicht erreicht. Es fiel lediglich auf, daß die klinischen Zeichen einer Infektion bei immunsupprimierten Tieren ausgeprägter waren als bei nicht vorbehandelten Tieren. Die bei nicht vorbehandelten Meer-schweinchen vorgefundenen Virulenzunterschiede zwischen *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) und Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) wurden bestätigt.

Wie Pennigton (39, 40) am Meerschweinchen zeigte, resultiert die kombinierte Gabe von Cyclophosphamid und einem Glucocorticoid in einer generellen Abnahme der Blutleukozyten, einer Reduktion ortsständiger (Alveolar-) Makrophagen und einer verminderten leukozytären Reaktion auf bakterielle Entzündungen. Aus Arbeiten von Hahn, Diamantstein et al. (12, 31) geht weiter hervor, daß mit Cyclophosphamid bzw. dessen aktivem Metaboliten die humorale Immunantwort blockiert (Hemmung der T-Helfer-Zellen) und die zytotoxische zellvermittelte Immunität

evtl. sogar verstärkt wird (Hemmung der T-Suppressor-Zellen bei der "delayed type hypersensitivity").

Der Kontakt mit Legionellen ruft bei Menschen und Versuchstieren humorale und zelluläre Immunität hervor (24). Abwehrge-schwächte insbesondere auch immunsupprimierte Personen gelten als Risikopatienten bei der Legionellose (2, 26, 41). Obwohl die genaue Funktion der humoralen und zellulären Immunantwort des Wirtsorganismus bei einer Legionelleninfektion noch nicht geklärt ist, deuten Ergebnisse verschiedener Autoren (27, 28, 29, 32, 33) darauf hin, daß der zellulären Immunität bei der Infektabwehr die entscheidende Rolle zufällt.

Makrophagen, die den Legionellen als möglicher Replikationsort dienen (27, 28, 32) und durch spezifische Legionellaantisera nicht vor der Zerstörung durch die Erreger geschützt werden (28, 33), sind unter bestimmten in-vitro-Bedingungen (mitogene Stimulation) in der Lage, Phagozytose und intrazelluläre Vermehrung der Legionellen herabzusetzen (29). Dies verdient um so mehr Beachtung, als für die Dissemination der Erreger im Wirtsorganismus neben einer direkten Invasion des Blutgefäßsystems auch eine Streuung über mit Keimen beladene Makrophagen in Betracht kommt (6, 30, 45).

Für die Bahnung einer Legionelleninfektion im mit Cyclophosphamid und Dexamethason vorbehandelten Tier kann also nicht begünstigend gewesen sein, daß diese Art der Immunsuppression eher die humorale Immunität beeinträchtigt und die Zahl der für die Vermehrung und Dissemination der Erreger evtl. wichtigen ortsständigen Makrophagen verringert.

Pennington verifizierte die Effizienz seines Systems zur Immunsuppression, indem er bei den Meerschweinchen über die Luftwege eine bakterielle Pneumonie erzeugte. Die von uns gewählte Keimapplikation ist intraperitoneal. Es bleibt offen, ob das angewandte Konzept der Immunsuppression auch im Peritonealraum zum Tragen kommt.

Das Meerschweinchen wird in Zukunft bei der Isolation von Legionellen wahrscheinlich nicht mehr die Bedeutung wie bei der Erstisolierung haben, da inzwischen stark verbesserte und auch selektive Kulturmedien zur Verfügung stehen (3, 14, 17, 18, 19). Wie aus der Literatur (20) hervorgeht, läßt sich bei Legionellen die Virulenz für Versuchstiere, die z. B. über mehrere Kulturpassagen nachgelassen hat, über die Tierpassage im Meerschweinchen zurückgewinnen. Das Meerschweinchen bietet sich weiterhin für pathohistologische Studien an, da die bei ihm entstehenden Läsionen denen beim Menschen beobachteten Gewebeläsionen sehr ähnlich sind (11, 30, 45).

V. ZUSAMMENFASSUNG

Zwei verschiedene Legionellastämme wurden auf ihre Virulenzunterschiede im Meerschweinchen untersucht. Bei *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Typ Philadelphia) gelang eine Infektion ab einem ip.-Inokulum von $\geq 10^2$ Keimen/ml, bei Serogruppe 4 (Typ Los Angeles) erst ab $\geq 10^8$ Keimen/ml. Dies entspricht einem Virulenzunterschied von 6 log-Stufen. Durch Immunsuppression mit Cyclophosphamid und Dexamethason wurde eine Infektionsbahnung versucht. Dabei konnten keine Unterschiede im Vergleich zum nicht vorbehandelten Tier gefunden werden. Die Virulenzunterschiede der Stämme konnten auch im immunsupprimierten Tier reproduziert werden.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. BERENDT, R.F., YOUNG, H.W., ALLEN, R.G., and KNUTSEN, G.L. (1980)
Dose-response of guinea pigs experimentally infected with aerosols of *Legionella pneumophila*
Journal of Infectious Diseases 141, 186-192
2. BOCK, B.V., KIRBY, B.D., EDELSTEIN, P.H., GEORGE, W.L., SNYDER, K.M., OWENS, M.L., HATAYAMA, C.M., HALEY, C.E., LEWIS, R.P., MEYER, R.D., FINEGOLD, S.M. (1978)
Legionnaires' disease in renal-transplant recipients
Lancet 1, 410-413 (February 25)
3. BOPP, C.A., SUMNER, J.W., MORRIS, G.K., and WELLS, J.G. (1981)
Isolation of *Legionella* spp. from environmental water samples by low-pH treatment and use of a selective medium
Journal of Clinical Microbiology 13, 714-719
4. BRENNER, D.J., STEIGERWALT, A.G., and McDADE, J.E. (1979)
Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova
Annals of Internal Medicine 90, 656-658
5. CENTER FOR DISEASE CONTROL (1978)
Isolates of organisms resembling Legionnaires' disease bacterium from environmental sources - Bloomington, Indiana
Morbidity and Mortality Weekly Report 27, 283-285
6. CHANDLER, F.W., McDADE, J.E., HICKLIN, M.D., BLACKMON, J.A., THOMASON, B.M., and EWING Jr., E.P. (1979)
Pathologic findings in guinea pigs inoculated intraperitoneally with the Legionnaires' disease bacterium
Annals of Internal Medicine 90, 671-675
7. CHERRY, W.B., PITTMAN, B., HARRIS, P.P., HEBERT, G.A., THOMASON, B.M., THACKER, L., and WEAVER, R.E. (1978)
Detection of Legionnaires' disease bacteria by direct immunofluorescent staining
Journal of Clinical Microbiology 8, 329-338

8. CHERRY, W.B. and McKINNEY, R.M. (1979)
Detection of Legionnaires' disease bacteria in clinical specimens by direct immunofluorescence
in: Laboratory Manual "Legionnaires'" the disease, the bacterium and methodology, G.L.Jones and G.A.Hébert (eds), pp. 92-103
U.S.Department of Health, Education and Welfare, Center for Disease Control, Atlanta, Georgia 30333 (May 1979)
9. CORDES, L.G., FRASER, D.W., SKALIY, P., PERLINO, C.A., ELSEA, W.R., MALLISON, G.F., and HAYES, P.S. (1980)
Legionnaires' disease outbreak at an Atlanta, Georgia, country club: Evidence for spread from an evaporative condenser
American Journal of Epidemiology 111, 425-431
10. CORDES, L.G., WIESENTHAL, A.M., GORMAN, G.W., PHAIR, J.P., SOMMERS, H.M., BROWN, A., YU, V.L., MAGNUSSEN, M.H., MEYER, R.D., WOLF, J.S., SHANDS, K.N., and FRASER, D.W. (1981)
Isolation of Legionella pneumophila from hospital shower heads
Annals of Internal Medicine 94, 195-197
11. DAVIS, G.S., WINN Jr., W.C., GUMP, D.W., CRAIGHEAD, J.E., and BEATY, H.N. (1982)
Legionnaires' pneumonia after aerosol exposure in guinea pigs and rats
American Journal of Respiratory Diseases 126, 1050-1057
12. DIAMANTSTEIN, T., KLOS, M., HAHN, H., and KAUFMANN, S.H.E. (1981)
Direct in vitro evidence for different susceptibilities to 4-hydroperoxycyclophosphamide of antigen-primed T cells regulating humoral and cell-mediated immune responses to sheep erythrocytes: A possible explanation for the inverse action of cyclophosphamide on humoral and cell-mediated immune responses
Journal of Immunology 126, 1717-1719
13. DONDERO Jr., T.J., RENDTORFF, R.C., MALLISON, G.F., WEEKS, R.M., LEVY, J.S., WONG, E.W., and SCHAFFNER, W. (1980)
An outbreak of Legionnaires' disease associated with a contaminated air-conditioning cooling tower
New-England Journal of Medicine 302, 365-370
14. EDELSTEIN, P.H., and FINEGOLD, S.M. (1979)
Use of a semiselective medium to culture Legionella pneumophila from contaminated lung specimens
Journal of Clinical Microbiology 10, 141-143

15. EDELSTEIN, P.H., MCKINNEY, R.M., MEYER, R.D., EDELSTEIN, M.A.C., KRAUSE, C.J., and FINEGOLD, S.M. (1980)
Immunologic diagnosis of Legionnaires' disease: Cross-reactions with anaerobic and microaerophilic organisms and infectious caused by them.
Journal of Infectious Diseases 141, 652-655
16. EDELSTEIN, P.H., MEYER, R.D., and FINEGOLD, S.M. (1980)
Laboratory diagnosis of Legionnaires' disease.
American Review of Respiratory Disease 121, 317-327
17. EDELSTEIN, P.H. (1981)
Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens.
Journal of Clinical Microbiology 14, 298-303
18. EDELSTEIN, P.H. (1982)
Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water.
Journal of Clinical Microbiology 16, 697-699
19. EDELSTEIN, P.H. (1983)
Culture diagnosis of *Legionella* infections.
Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abt. Originale A 255, 96-101
20. ELLIOTT, J.A. and JOHNSON, W. (1982)
Virulence conversion of *Legionella pneumophila* serogroup 1 by passage in guinea pigs and embryonated eggs.
Infection and Immunity 35, 943-946
21. FEELEY, J.C., GIBSON, R.J., GORMAN, G.W., LANGFORD, N.C., RASHEED, J.K., MACKEL, D.C., and BAINE, W.B. (1979)
Charcoal-yeast extract agar: Primary isolation medium for *Legionella pneumophila*.
Journal of Clinical Microbiology 10, 437-441
22. FLIERMANS, C.B., CHERRY, W.B., ORRISON, L.H., and THACKER, L. (1979)
Isolation of *Legionella pneumophila* from nonepidemic-related aquatic habitats.
Applied and Environmental Microbiology 37, 1239-1242

23. FRASER, D.W., TSAI, T.R., ORENSTEIN, W., PARKIN, W.E., BEECHAM, H.J., SHARRAR, R.G., HARRIS, J., MALLISON, G.F., MARTIN, S.M., McDADE, J.E., SHEPARD, C.C., BRACHMAN, P.S. and the Field Investigation Team (1977)
Legionnaires' disease: Description of an epidemic of pneumonia
New England Journal of Medicine 297, 1189-1197
24. FRIEDMAN, H., KLEIN, T., WIDEN, R. (1982)
Zelluläre und humorale Immunität gegenüber *Legionella pneumophila*.
in: Neues von "alten" Erregern und neue Erreger, Infektiologisches Kolloquium 1, Hrsg. C.KRASEMANN, pp. 99-109;
de Gruyter: Berlin, New York, 1983
25. GORMAN, G.W., YU, V.L., BROWN, A., HALL, J.A., MARTIN, W.T., BIBB, W.F., MORRIS, G.K., MAGNUSSEN, M.H., and FRASER, D.W. (1980)
Isolation of Pittsburgh pneumonia agent from nebulizers used in respiratory therapy.
Annals of Internal Medicine 93, 572-573
26. GUMP, D.W., FRANK, R.O., WINN Jr., W.C., FOSTER Jr., R.S., BROOME, C.V., and CHERRY, W.B. (1979)
Legionnaires' disease in patients with associated serious disease.
Annals of Internal Medicine 90, 538-542
27. HORWITZ, M.A. and SILVERSTEIN, S.C. (1980)
Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiplies intracellularly in human monocytes.
Journal of Clinical Investigation 66, 441-450
28. HORWITZ, M.A. and SILVERSTEIN, S.C. (1981)
Interaction of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) with human phagocytes.
II. Antibody promotes binding of *L. pneumophila* to monocytes but does not inhibit intracellular multiplication.
Journal of Experimental Medicine 153, 398-406
29. HORWITZ, M.A. and SILVERSTEIN, S.C. (1981)
Activated human monocytes inhibit the intracellular multiplication of Legionnaires' disease bacteria.
Journal of Experimental Medicine 154, 1618-1635
30. KATZ, S.M. and HASHEMI, S. (1982)
Electron microscopic examination of the inflammatory response to *Legionella pneumophila* in guinea pigs.
Laboratory Investigation 46, 24-32

31. KAUFMANN, S.H.E., HAHN, H., and DIAMANTSTEIN, T. (1980)
Relative susceptibilities of T cell subsets involved in delayed-type hypersensitivity to sheep red blood cells to the in vitro action of 4-hydroperoxycyclophosphamide
Journal of Immunology 125, 1104-1108
32. KISHIMOTO, R.A., KASTELLO, M.D., WHITE, J.D., SHIREY, F.G., MCGANN, V.G., LARSON, E.W., and HEDLUND, K.W. (1979)
In vitro interaction between normal cynomolgus monkey alveolar macrophages and Legionnaires' disease bacteria.
Infection and Immunity 25, 761-763
33. KISHIMOTO, R.A., WHITE, J.D., SHIREY, F.G., MCGANN, V.G., BERENDT, R.F., LARSON, E.W., and HEDLUND, K.W. (1981)
In vitro response of guinea pig peritoneal macrophages to Legionella pneumophila.
Infection and Immunity 31, 1209-1213
34. KLEIN, G.C. (1980)
Cross-reaction to Legionella pneumophila antigen in sera with elevated titers to Pseudomonas pseudomallei.
Journal of Clinical Microbiology 11, 27-29
35. MAKELA, T.M., HARDERS, S.J., CAVANAGH, P. (1980)
Growth of Legionella pneumophila in guinea pigs.
Lancet 2, 1305
36. McDADE, J.E., SHEPARD, C.C., FRASER, D.W., TSAI, T.R., REDUS, M.A., DOWDLE, W.R., and the Laboratory Investigation Team (1977)
Legionnaires' Disease: Isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease.
New England Journal of Medicine 297, 1197-1203
37. McKINNEY, R.M., THACKER, L., HARRIS, P.P., LEWALLEN, K.R., HEBERT, G.A., EDELSTEIN, P.H., and THOMASON, B.M. (1979)
Four serogroups of Legionnaires' disease bacteria defined by direct immunofluorescence.
Annals of Internal Medicine 90, 621-624

38. MORRIS, G.K., PATTON, C.M., FEELEY, J.C., JOHNSON, S.E., GORMAN, G., MARTIN, W.T., SKALIY, P., MALLISON, G.F., POLITI, B.D., and MACKEL, D.C. (1979)
Isolation of the Legionnaires' disease bacterium from environmental samples
Annals of Internal Medicine 90, 664-666
39. PENNINGTON, J.E. (1977)
Quantitative effects of immunosuppression on bronchoalveolar cells
Journal of Infectious Diseases 136, 127-131
40. PENNINGTON, J.E. (1978)
Differential effects of cyclophosphamide and cortisone acetate on bronchoalveolar phagocytic cell populations
American Review of Respiratory Diseases 118, 319-342
41. SARAVOLATZ, L.D., BURCH, K.H., FISHER, E., MADHAVAN, T., KIANI, D., NEBLETT, T., and QUINN, E.L. (1979)
The compromised host and Legionnaires' disease
Annals of Internal Medicine 90, 533-537
42. WEAVER, R.E., FEELEY, J.C. (1979)
Cultural and biochemical characterization of the Legionnaires' disease bacterium
in: Laboratory Manual "Legionnaires'" the disease, the bacterium and methodology, G.L.Jones and G.A.Hébert (eds), pp. 19-25
U.S.Department of Health, Education and Welfare, Center for Disease Control, Atlanta, Georgia 30333 (May 1979)
43. WILKINSON, H.W., FARSHY, C.E., FIKES, B.J., CRUCE, D.D., and YEALY, L.P. (1979)
Measure of immunoglobulin G-, M-, and A-specific titers against Legionella pneumophila and inhibition of titers against nonspecific, gram-negative bacterial antigens in the indirect immunofluorescence test for legionellosis
Journal of Clinical Microbiology 10, 685-689
44. WILKINSON, H.W. and FIKES, B.J. (1980)
Slide agglutination test for serogrouping Legionella pneumophila and atypical Legionella-like organisms
Journal of Clinical Microbiology 11, 99-101
45. WINN Jr., W.C., DAVIS, G.S., GUMP, D.W., CRAIGHEAD, J.E., and BEATY, H.N. (1982)
Legionnaires' pneumonia after intratracheal inoculation of guinea pigs and rats
Laboratory Investigation 47, 568-578

VII. LEBENSLAUF

Friedrich Kurt L u d w i g

- 27.04.1952 geboren als Sohn des Dipl.-Ing. Friedrich G. Ludwig und seiner Ehefrau Johanna geb. Henning, in Düsseldorf.
- 1958 - 1962 Grundschulausbildung an der ev. Volksschule in Büberich bei Düsseldorf.
- 1962 - 1972 Besuch des Comenius-Gymnasiums in Düsseldorf mit Abschluß Abitur am 15.05.1972
- 1972 - 1973 Studium der Chemie an der TU Hannover
- 1973 - 1975 MTA-Ausbildung an der MH Hannover mit bestandenem Staatsexamen am 24.03.1975
- 1975 - 1976 Medizinstudium an der Universität Nantes/Frankreich
- 1976 - 1982 Medizinstudium an der FU Berlin mit bestandenem Staatsexamen am 08.12.1982
- 21.01.1982 erfolgreiche Teilnahme an der ECFMG-Examination am Amerikahaus in Berlin (West)
- 04.01.1983 Erteilung der Approbation
- 01.03.1983 Einstellung als Assistenzarzt in der Abt. Mikrobiologie des Rudolf-Virchow-Krankenhauses, Berlin

